

Aus dem Institut für Vegetative Anatomie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Identifikation regulatorischer Proteine des Na⁺- K⁺- 2Cl⁻-
Kotransporters (NKCC2) in der Niere**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Alexandra Bianca Böhlick

aus Lübben (Spreewald)

Gutachter: 1. Prof. Dr. S. Bachmann
 2. Prof. Dr. M. Bader
 3. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. M. Gollasch

Datum der Promotion: 24.02.2012

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Zusammenfassung	1
Abkürzungsverzeichnis	2
1. Einleitung	3
2. Material und Methoden	5
3. Ergebnisse	10
4. Diskussion	14
5. Referenzliste	17
6. Anteilserklärung	21
7. Publikationen	23
Lebenslauf	54
Komplette Publikationsliste	55
Selbstständigkeitserklärung (Eidesstattliche Erklärung)	57
Danksagung	58

ZUSAMMENFASSUNG

Der nierenspezifische $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ (NKCC2) und der $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ (NCC) sind integrale Membranproteine, die im distalen Tubulus lokalisiert sind und zur Gen-Familie der Kationen-Chlorid Kotransporter gehören. Sie sind für die transepitheliale Resorption von NaCl aus dem Primärharn von zentraler Bedeutung und wurden in der vorliegenden Arbeit im Hinblick auf ihre funktionelle Regulation näher untersucht. Das antidiuretische Hormon (ADH) bewirkt in der Niere eine luminale Insertion des Wassertransporters Aquaporin 2 (AQP2) im Sammelrohr und des NKCC2 im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife (TAL), woraufhin vermehrt Wasser und Salze zurückresorbiert werden. Ich habe untersucht, inwiefern *Lipid rafts* für den Einbau von NKCC2 in die Plasmamembran und die Aktivität eine Rolle spielen. Diese Versuche wurden an Nieren von adulten männlichen Brattleboro-Ratten sowie an kultivierten Zellen aus dem TAL von Kaninchen durchgeführt. Um eventuell vorhandene, auf den Transport oder die Aktivität des NKCC2 wirkende regulatorische Proteine zu finden, habe ich die *Lipid raft* Fraktionen mittels Massenspektrometrie analysiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass ein Anteil des NKCC2 wie auch des NCC in der *Lipid raft* Fraktion enthalten ist. Nach Kurzzeitbehandlung (60 min) der Ratten bzw. der kultivierten TAL Zellen mit ADH habe ich eine erhöhte apikale Konzentration und eine Verschiebung des NKCC2 aus cholesterinarmen Membranfraktionen in die cholesterinreichen *Lipid raft* Fraktionen gesehen. Auch die konfokalen Aufnahmen zeigen eine verstärkte Kolo-kalisation des NKCC2 mit dem *Lipid raft*-Markerlipid Gangliosid M1 (GM1) nach Applikation von ADH. Diese Effekte können durch Cholesterindepletion (CD) und somit Disintegration der *Lipid rafts* auf Kontrollniveau reduziert werden.

Die Effekte von ADH auf den NCC wurden ebenfalls von uns untersucht und zeigen, dass nach Kurzzeitbehandlung von Ratten mit dem V2-Rezeptor (V2-R)-Agonisten Desmopressin (dDAVP) eine verstärkte Phosphorylierung und eine Umverteilung des NCC in die luminale Membran stattfindet.

Die massenspektrometrische Analyse der *Lipid raft* Fraktion aus dem Innenstreifen der Nieren männlicher Wistar-Ratten zeigte den NKCC2 als ein in *Lipid rafts* enthaltenes Protein. Ein anderes Protein, das ebenfalls in *Lipid rafts* enthalten und als solches bereits publiziert wurde, ist das Tamm-Horsfall Protein (THP), welches ich mit dieser Methode bestätigen konnte.

Die Resultate zeigen, dass *Lipid rafts* bei der polaren Sortierung von Membranproteinen, der Aktivität und dem ADH-induzierten *Trafficking* von NKCC2 eine Rolle spielen. Durch die massenspektrometrische Analyse der *Lipid raft* Fraktion habe ich eine Liste mit bereits bekannten und mit noch unbekanntem *Lipid raft* Proteinen erhalten, die neben dem NKCC2 in den cholesterinreichen *Raft*-Membranen zu finden sind. Außerdem zeigen unsere Ergebnisse eine neue V2-R vermittelte NCC Signalkaskade, die die transepitheliale Resorption von NaCl im frühen distalen Tubulus (DCT1) reguliert, indem nach dDAVP Stimulation der Anteil an phosphoryliertem NCC im DCT1 in der apikalen Membran ansteigt.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADH/AVP	Antidiuretisches Hormon (Arginin-Vasopressin)
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCC	Kationen-Chlorid Kotransporter (<i>cation chloride cotransporter</i>)
CD	Cholesterindepletion
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
DCT	distales Konvolut der Henle-Schleife
dDAVP	Desmopressin (1-desamino-8-D-arginine Vasopressin)
DRM	gegenüber Detergenzien unempfindliche Membranbestandteile (<i>detergent resistant membranes</i>)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GM1	Gangliosid M1
GPI	Glycosyl Phosphatidylinositol
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IHC	Immunohistochemie
kDa	kilo Dalton
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie-Tandem Massenspektrometrie
LR-White	<i>London Resin-White</i> Harz
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
M β CD	Methyl- β -Cyclodextrin
NCC	Natrium-Chlorid-Kotransporter (<i>Na⁺-Cl⁻-cotransporter</i>)
NKA	Natrium-Kalium ATPase
NKCC2	Natrium-Kalium-2Chlorid-Kotransporter (<i>Na⁺-K⁺-2Cl⁻-cotransporter</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte NaCl-Lösung
PM	Plasmamembran
PFA	Paraformaldehyd
rbTAL	immortalisierte Kaninchen Zellen aus der dicken aufsteigenden Henle-Schleife
RME	<i>raft mediated endocytosis</i>
SDS	Natrium-dodecylsulfat (<i>sodium dodecylsulfate</i>)
SV-40	<i>Simian-virus 40</i>
TAL	dicke aufsteigende Henle-Schleife (<i>thick ascending limb of Henle</i>)
TGN	Trans-Golgi Netzwerk
THP	Tamm-Horsfall Protein (Uromodulin)
V2-R	Vasopressin 2-Rezeptor
WB	Western blot
ZO-1	zona occludens 1

1. EINLEITUNG

Die Nieren sind die zentralen Regulationsorgane des Wasser- und Elektrolythaushaltes im Körper, die für die Konstanzhaltung des Volumens und der Osmolarität im Extrazellulärraum notwendig sind. Sie filtern pro Tag bis zu 180 L Blutplasma, wovon 99% wieder rückresorbiert werden und ca. 1,8 L pro Tag in Form von Urin ausgeschieden werden.

Die funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron, welches sich in Bowman-Kapsel mit Glomerulus, proximales Konvolut, Henlesche Schleife, distales Konvolut, Verbindungstubulus und Sammelrohr untergliedert. Der distale Tubulus, Teil der Henle-Schleife und Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit, unterteilt sich in Pars recta (dicke aufsteigende Henle-Schleife, TAL) und Pars convoluta (distales Konvolut, DCT). Zentral sind für die Funktion des TAL der Bumetanid-sensitive $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ (NKCC2) und für den DCT der Thiazid-sensitive $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ (NCC) verantwortlich. Beide Transporter gehören zusammen mit dem $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ (KCC) zur Gen-Familie der Kationen-Chlorid-Kotransporter (CCC; SLC12A). Die Genprodukte des SLC12A3 (NCC) und des SLC12A6 (KCC) sind zu 45-50% identisch, während die Genprodukte des SLC12A1 (NKCC2) mit denen des SLC12A3 (NCC) 25 % Homologie aufweisen [1].

Es sind 2 verschiedene Isoformen des NKCC bekannt, wobei die als erstes identifizierte Isoform, der NKCC1, aus der Rektaldrüse des Haies war (SLC12A2) [2]. Dieselbe Isoform wurde auch von Delpire *et al.* aus Sammelrohrzellen der Maus identifiziert und als Bumetanid-sensitiver Kotransporter (BSC2) bezeichnet [3]. Der NKCC1 kommt ubiquitär im Körper vor und ist besonders in der basolateralen Membran sekretorischer Epithelien exprimiert. Die Arbeitsgruppe um Hebert *et al.* hat 1994 die zweite Isoform der NKCC, den NKCC2, in der Ratte kloniert und charakterisiert [4]. Später haben Forbush *et al.* den NKCC2 auch im Kaninchen charakterisiert [5, 6]. Der NKCC2 kommt im Körper nur im TAL der Niere vor und kann in seiner Transportaktivität durch die Schleifendiuretika Bumetanid und Furosemid geblockt werden. Ein Defekt des NKCC2 kann autosomal rezessiv vererbt werden und im Bartter-Syndrom Typ I resultieren, bei welchem Natrium- und Chloridionen nicht ausreichend rückresorbiert werden können und somit der Urin nicht genügend konzentriert werden kann. Symptome äußern sich unter anderem in Form von Polyhydramnion [7, 8], Salz- und Volumenverlust nach der Geburt, hypokaliämischer Alkalose [9], Hyperkalzämie und Nephrokalzinose [10, 11] sowie Hyperreninämie [12, 13].

Vom NKCC2 sind 3 verschiedene *Splice*-Varianten bekannt, der NKCC2A, NKCC2B und NKCC2F [6, 14-17]. Diese werden in unterschiedlichen Bereichen des TAL exprimiert. Die F-Variante kommt nur im Innenstreifen der äußeren Medulla vor, der NKCC2A wird nur im Außenstreifen der äußeren Medulla sowie im Kortex exprimiert, und der NKCC2B konnte spezifisch an der Macula Densa sowie im kortikalen TAL nachgewiesen werden [6, 14, 15, 18]. Diese Varianten entstehen durch alternatives *Splicing* des Exon 4, auf dem die zweite Transmembrandomäne und Teile des anschließenden intrazellulären *Loops* des Transporters kodiert sind [19, 20].

Die Kotransporter des distalen Tubulus sind hormonell stimulierbar [21]. Ich habe in den Versuchen das antidiuretische Hormon (ADH), auch Vasopressin oder Arginin-Vasopressin

(AVP) verwendet, von welchem ein stimulierender Effekt auf die Transportleistung des NKCC2 bekannt war [22]. ADH ist ein Peptidhormon aus der Neurohypophyse, das über das Blutgefäßsystem in die Niere gelangt und dort – als sein bekanntester Effekt – über V2-Rezeptorbindung im Sammelrohr die Wassertransport-Regulation beeinflusst [23]. Im TAL bindet ADH ebenfalls an den V2-Rezeptor (V2-R) [24, 25] und löst hier eine Signalkaskade über den *second messenger* cAMP aus, die in einem gesteigerten Einbau des NKCC2 in die Plasmamembran und somit in gesteigerter Transportaktivität resultiert.

Bei der Aktivierung von Transportern sind generell mehrere zelluläre Mechanismen wie Vesikel-*Trafficking*, Exozytose und Membranmodifikationen beteiligt. Zu den letzteren gehört die variable Ausstattung mit Lipiden wie Cholesterin und Sphingolipiden [26]. So genannte *Lipid rafts* sind spezielle, mit Cholesterin und Sphingolipiden angereicherte, ca. 200 nm große Membran-Mikrodomänen in der Doppellipidschicht [27]. Die Größe dieses Areals kann in einer Zelle jedoch auch variieren [28]. *Rafts* können unterschiedliche Proteine enthalten. Membranproteine können mit ihrer Transmembrandomäne in Kontakt mit *Raft*-Lipiden treten und ihr Verhalten dadurch ändern. In der Definition der *Lipid rafts* ist enthalten, dass sie bei 4°C in Detergenzien wie Triton X-100 unlöslich und hierdurch im Gradienten darstellbar sind [27]. Brown und Rose haben hierzu erste Daten erarbeitet [29]. So kam auch die Bezeichnung der *Rafts* als *detergent resistant membranes* (DRM) zustande [30].

Die Funktionen der *Lipid rafts* werden aktuell intensiv erforscht. Es ist bekannt, dass sie in der Signaltransduktion eine Rolle spielen, wie beispielsweise durch Field et al. anhand des FcεRI-Rezeptors gezeigt wurde [30]. Außerdem gibt es Hinweise dafür, dass *Rafts* für eine Sortierung apikaler Proteine notwendig sind, die nach ihrer Synthese im endoplasmatischen Retikulum (ER) und weiterer Modifikation im Trans-Golgi Netzwerk (TGN) in apikal gerichtete Vesikel inseriert werden [31]. Dimer- und Oligomerbildungen sowie Bindung an zytosolische Mittlerproteine können durch *Raft*-Insertion der Proteine gefördert werden. Um die Funktion der *Lipid rafts* zu untersuchen, kann ihre Zerstörung durch Cholesterin depletierende Agenzien wie der Zuckerverbindung Methyl-β-Cyclodextrin (MβCD) erwogen werden, welches selektiv Cholesterin aus der Plasmamembran herauslöst [32, 33].

Das Ziel der hier vorgelegten Arbeit war es, die Rolle der *Lipid rafts* im Hinblick auf Sortierungsmechanismen und Funktion des NKCC2-Kotransporters in der Niere näher zu beleuchten. Mit Hilfe der Massenspektrometrie habe ich nach weiteren Proteinen gesucht, die ebenfalls in *Lipid rafts* enthalten sind und eventuell eine Rolle in der Regulation des NKCC2 spielen könnten. Außerdem sollte die Rolle des ADH auf den Einbau des NKCC2 in *Lipid rafts* untersucht werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 2.1. Auswahl verwendeter Antikörper

Antikörper	Wirt	Molekulargewicht [kDa]	Verdünnung	Herkunft
β-Aktin	Maus, monoklonal	42	1:20.000 (WB)	Sigma
Clathrin	Maus, monoklonal	180	1:500 (WB)	Progene
Flotillin-1	Maus, monoklonal	48	1:1.000 (WB)	BD Transduction Laboratories
Gangliosid GM1	Kaninchen	-	1:500 (Dot blot)	Abcam
NCC-R7	Kaninchen	165	1:500 (WB) 1:1.000 (IHC)	D. H. Ellison, Portland, Oregon
pS71-NCC	Kaninchen	165	1:300 (IHC)	S. Uchida, Nagoya, Japan
Rat-NKCC2, N-terminus	Meerschweinchen	160	1:500 (WB) 1:250 (IHC)	D. H. Ellison, Portland, Oregon
THP	Kaninchen	98	1:250 (WB)	J. R. Hoyer, Philadelphia, Pennsylvania
V2-R	Kaninchen	50	1:250 (WB)	Alpha Diagnostic
ZO-1	Kaninchen	225	1:500 (IHC)	Zymed Laboratories

Zellkultur

Für die Versuche habe ich Zellen aus der Medulla der Kaninchenniere (rbTAL) benutzt, die mit rekombinanter DNA der SV40 Region (Immortalisierung durch Polyomavirus) sowie mit pSV2-neo DNA (Resistenz für das Antibiotikum) kotransformiert und uns von der Arbeitsgruppe R. Kinne zur Verfügung gestellt wurden [34-36]. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und 7.5% CO₂ in DMEM/Ham's F-12 Medium mit Zusatz von 1% L-Glutamin, 15 mM HEPES, 1% Penicillin/Streptomycin, 5% fetales Kälberserum (PAN Biotech) und 1% nichtessentieller Aminosäuren (Sigma). Zur Stimulation des NKCC2 wurden die Zellen 60 min mit 0.1 µM Arginin-Vasopressin (ADH, Sigma) im Kulturmedium behandelt.

Die Disintegration der *Lipid rafts* erfolgte durch selektives Herauslösen des Cholesterins aus der Plasmamembran sowie durch Hemmung der Cholesterinsynthese. Dies geschah durch eine in 2 Stufen verlaufende Blockade, wobei der erste Schritt der Hemmung der Cholesterin-Synthese diente, indem eine 24 stündige Inkubation mit 0.25 mM Mevalonat und 4 µM Lovastatin erfolgte. Lovastatin unter Vorhandensein von kleinen Mengen Mevalonat verringert die *de-novo* Synthese von Cholesterin, indem die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzym A (HMG-CoA)-Reduktase gehemmt wird, welche ein primär notwendiges Enzym in der Cholesterinsynthese ist [37]. Der zweite Schritt bewirkt, dass das apikale Cholesterin aus der Plasmamembran herausgelöst wird, indem die Zellen für 60 min mit 10 mM MβCD, einem zyklischen Oligosaccharid, behandelt werden. Dadurch lösen sich neben dem Cholesterin auch die anhängenden Proteine aus der Membran heraus. Histochemische Kontrollfärbungen mit dem Antibiotikum Filipin (Sigma), welches spezifisch an Cholesterin bindet, konnten die erfolgte Cholesterindepletion bestätigen.

Die Oberflächenbiotinylierung der kultivierten rbTAL Zellen erfolgte mit dem Sulfo-NHS-Biotin-Kit (Pierce). Hierzu wurden die Zellen bei 4°C für 30 min mit dem Biotin inkubiert. Nach

Entfernen der Inkubationslösung wurde überschüssiges Biotin durch Waschen mit PBS/100 mM Glycin abgefangen. Die Zellen wurden dann abgeschabt, bei 18.000xg und 4°C für 30 min zentrifugiert und das Pellet, welches die Membranfraktion enthält, sowie der Überstand, der die zytosolischen Bestandteile enthält, mit Protein-G gekoppelten *Microbeads* (MACS, Miltenyi) inkubiert. Die Separation der biotinylierten Proteine wurde durch die magnetischen *Microbeads* erreicht. Die Analyse der biotinylierten Proben erfolgte durch SDS-PAGE und Western blot.

Isolation von Nierentubuli

Wistar-Ratten (250-300g) aus unserer Tierabteilung (Charité Berlin) wurden mit Isofluran betäubt und dekapitiert. Nach dem Ausbluten wurden sofort beide Nieren entnommen und Medulla und Kortex getrennt. Die Kortex-Fraktion wurde 10 min bei 37°C mittels Collagenase Typ II (306 U/ml, Pan Biotech) und Protease Typ XIV (9,4 U/ml, Sigma) verdaut und die resultierende Tubulussuspension anschließend in Sortierlösung aufgenommen, die zum Abstoppen der Enzymaktivität Albumin enthielt. Nach dem Waschen der Tubulussuspension mit PBS erfolgte die Stimulation für 30 min bei 37°C im Schüttler mittels Zugabe von 10^{-6} M Desmopressin bzw. 1-desamino-8-D-arginine Vasopressin (dDAVP), einem V2R Agonisten, in REGM (Renal epithelial growth medium, Lonza) Kulturmedium. Danach wurden die Tubuli wieder in PBS gewaschen, auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger getropft und mit 3% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Die Tubuli wurden mit spezifischem Primärantikörper inkubiert, gefolgt von einem mit Fluorochrom gekoppelten Sekundärantikörper. Die Auswertung des Signals erfolgte am konfokalen Fluoreszenzmikroskop.

SDS Polyacrylamid Gel-Elektrophorese

Prinzip der Natrium-dodecylsulfat Polyacrylamid Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) ist die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld. Hierfür wurden die Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine aufgebrochen, indem diese kurz im Probenpuffer erhitzt wurden. Der Puffer enthielt das reduzierende Thiol β -Mercaptoethanol, wodurch die Disulfidbrücken gespalten wurden. Außerdem habe ich zum Puffer das anionische Tensid SDS im Überschuss zugegeben, wodurch die Eigenladungen der Proteine überdeckt wurden und diese eine konstant negative Ladungsverteilung aufwiesen. Die Trennung des denaturierten Proteingemisches erfolgte in einem Gel aus 10% Polyacrylamid, worin durch Anlegen einer elektrischen Spannung eine Migration der negativ geladenen Proteine erfolgte. Als Elektrolyt wurde das durch Laemmli beschriebene SDS-haltige Tris-Glycin Puffersystem eingesetzt [38].

Western blot

Nach der Auftrennung im Gel wurden die Proteine mittels Western blot (WB) bzw. Immunoblot auf eine Trägermembran, hier Nitrocellulose-Membran übertragen, indem ein elektrisches Feld angelegt wurde. Die Proteine blieben aufgrund hydrophober Wechselwirkungen an der Membran haften und konnten hierauf mit Hilfe verschiedener Antikörper identifiziert werden. Zur Detektion eines bestimmten Proteins wurde die Membran mit einem spezifischen Primärantikörper bei 4°C in 5% Milch/PBS über Nacht inkubiert, an den in einem weiteren

Inkubationsschritt bei Raumtemperatur ein HRP-gekoppelter Sekundärantikörper gebunden hat. Das Signal wurde mit Hilfe eines Chemilumineszenz-Kits (GE Healthcare) generiert, wobei die Schwärzung eines auf die Membran aufgelegten Röntgenfilms (GE Healthcare) durch Lichtemission erfolgte.

Dot blot

Für die Lipidanalyse des Gangliosids GM1 in den *Lipid raft* Präparationen aus Rattennieren bzw. Zellkultur wurden diese mit dem Orgo-Sol Präzipitations-Kit (Calbiochem) gefällt und das Pellet in 10µl Puffer [0.5% Natrium Deoxycholat, 20% Methanol, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl sowie Protease Inhibitor (Roche)] aufgenommen [39]. Diese Lösung wurde auf Nitrocellulose Membran getropft und getrocknet. Die nun auf der Membran befindlichen Proteine konnten mit Ponceau Rot sichtbar gemacht und durch die darin enthaltene Essigsäure fixiert werden. Nach dem Blockieren der Membran bei Raumtemperatur in 5% Milch/PBS für 30 min wurde wie beim Western blot weiterverfahren, indem die Membran mit einem gegen GM1 gerichteten Primärantikörper und dann mit entsprechendem Sekundärantikörper inkubiert wurde. Das Signal habe ich durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht.

Lipid raft Präparation

Um die *Lipid rafts* zu isolieren, habe ich zuerst das entsprechende Gewebe bzw. die Zellen aufgebrochen, indem sie im Homogenisierungspuffer (10 mM Triethanolamin, 250 mM Sucrose, Protease Inhibitor, pH 7,5) gelöst und durch Ultraschallbehandlung (5x5 sec) lysiert wurden. Die darauf folgende Zentrifugation des Homogenats bei 800xg für 10 min bei 4°C diente der Abtrennung von Zellkernen und von nicht aufgetrenntem Material. Der Überstand wurde bei 18.000xg für 60 min bei 4°C zentrifugiert, um im resultierenden Pellet die Plasmamembran mit anhängenden Vesikeln zu gewinnen. Um die *Lipid rafts* von den restlichen Bestandteilen der Plasmamembran zu trennen, wurde das Pellet in Homogenisierungspuffer solubilisiert und bei 4°C in 1% Triton X-100 für 60 min inkubiert. Durch die Zentrifugation im Sucrosegradienten, in dem die Probe in 40% Sucrose vorlag und jeweils mit 30% und 5% Sucrose überschichtet wurde, konnte bei 200.000xg im Ausschwingrotor für 16h bei 4°C eine Auftrennung der *Lipid rafts* erreicht werden. Diese befanden sich im Bereich niedriger Dichte (zwischen 5% und 30% Sucrose) und waren als dünne weißliche Schicht sichtbar. Der Sucrose-Gradient wurde auf 10 Fraktionen aufgeteilt, die ich nacheinander von oben nach unten abpipettiert habe. Die einzelnen Fraktionen konnten nun mittels SDS-PAGE und Western blot auf ihre spezifische Proteinzusammensetzung bzw. mittels Dot blot und Dünnschichtchromatographie auf ihre Lipidzusammensetzung hin untersucht werden.

Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie ist ein physikalisch-chemisches Trennverfahren, das für meine Arbeit zur Untersuchung der Lipidzusammensetzung in *Lipid raft* Präparationen diente. Die Auftrennung erfolgte auf einer Trägerplatte aus Glas, auf der sich die stationäre Phase (Kieselgel) als dünne Schicht befand. Auf diese wurden die Proben sowie entsprechende

Vergleichssubstanzen (Cholesterol, Phosphatidylcholin, Sphingomyelin [Sigma]) in einer Startlinie aufgetragen und die Platte dann in eine Chromatographiekammer mit einem Fließmittel gestellt, dessen mobile Phase aus Chloroform/Methanol/H₂O im Verhältnis von 65:25:4 angesetzt wurde. Das Fließmittel saugte sich über Kapillarkräfte in die stationäre Phase nach oben. Dabei lösten sich die aufgetragenen Proben im Fließmittel und wurden je nach Anziehungskraft der stationären und der mobilen Phase aufgetrennt, d.h. je nach Kräfteverhältnis blieb ein Teilchen eher bei der Startlinie oder wanderte weiter nach oben. Die Sichtbarmachung der Lipide auf der Trägerplatte erfolgte durch Besprühen mit 20% H₂SO₄ und Erhitzen bei 120°C. Die erhaltenen Signale auf der Trägerplatte habe ich eingescannt und densitometrisch ausgewertet.

Immunohistochemie

Die Immunmarkierung mit Antikörpern erfolgte beim Gewebe auf 4µm dicken Paraffinschnitten bzw. auf 7µm dicken Cryostatschnitten. Kultivierte rbTAL Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und für die Immunohistochemie (IHC) verwendet, sobald ein konfluenter Zellrasen gewachsen war. Die Zellen wurden bei 4°C in 3% PFA für 10 min fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Cryostatschnitte und kultivierte rbTAL Zellen wurden bei Raumtemperatur in 0.5% Triton X-100 für 30 min inkubiert, um die Zelloberfläche für Antikörper passierbar zu machen. Paraffinschnitte wurden in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und danach 6 min in Zitratpuffer im Dampfkochtopf gekocht. Das Blockieren der Gewebeschnitte bzw. der Zellen erfolgte bei Raumtemperatur in 5% Milch/PBS für 30 min. Danach habe ich diese mit einem spezifischen Primärantikörper bei 4°C in 5% Milch/PBS über Nacht inkubiert. Der folgende Inkubationsschritt bei Raumtemperatur für 60 min diente der Bindung des Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpers. Das Signal wurde mittel Fluoreszenz- bzw. Konfokalmikroskopie ausgewertet.

Fluoreszenzmikroskopie und *Laser-scanning*-Konfokalmikroskopie

Die Auswertung der mit Fluoreszenzfarbstoffen immunmarkierten Zellen und Paraffinschnitte erfolgte an einem DMRB Lichtmikroskop (Leica) mit einer digitalen Kamera (Spot 32, Diagnostic Instruments). Die Digitalisierung der aufgenommenen Photos erfolgte mit der Software Metaview (Visitron). Um konfokale Bilder aufzunehmen und diese quantitativ auszuwerten, habe ich ein konfokales *Laser-Scanning*-Mikroskop genutzt, das mit einem Multilasersystem (Argon-Laser 458-514 nm, Helium-Neon-Laser 543 nm, Helium-Neon-Laser 633 nm, Leica) sowie der dazu gelieferten Software (Zen) von Leica ausgestattet war.

Elektronenmikroskopische Analyse

Um die Ultrastruktur der *Lipid rafts* zu untersuchen, wurden die entsprechenden Fraktionen des Sucrosegradienten gesammelt, mit 3% PFA und 0,05% Glutaraldehyd fixiert und dann in LR-White Harz (London Resin) eingebettet. Hieraus wurden Ultradünnschnitte hergestellt, die mit spezifischen Primärantikörpern und Gold-gekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert wurden. Die Auswertung der Schnitte erfolgte am Elektronenmikroskop der Firma Zeiss (Zeiss EM 906).

Massenspektrometrie

Die Analyse von membrangebundenen Proteinen mithilfe der Massenspektrometrie stellt besondere Herausforderungen an die biochemische Aufarbeitung dar, da diese Proteine in polaren Lösungsmitteln nur schwer löslich sind und leicht ausfallen oder aggregieren können. Die konventionelle 2D-Elektrophorese ist für die Auftrennung von Membranproteinen eher ungeeignet, da die Hydrophobizität der Proteine der Effizienz der Auftrennung entgegensteht [40]. Aus diesem Grund habe ich mich zur Probenvorbereitung für die *Displacement*-Chromatographie entschieden, eine Methode zur chromatographischen Auftrennung eines tryptischen Peptidgemisches auf einer Kationenaustauschersäule.

Die in *Rafts* inserierten bzw. mit *Rafts* assoziierten Membranproteine habe ich, wie von Ruth et al. vorgestellt [41], mit 8M Harnstoff präzipitiert und nach dem Trypsinverdau auf einer *Reversed phase*-Säule entsalzt. Die darauf folgende Auftrennung mit der *Displacement*-Chromatographie basiert auf der kompetitiven Bindung der Peptide sowie einer zusätzlichen Komponente, dem *Displacer*, auf einer Säule mit stationärer Phase. Die Peptide mit der höchsten Affinität zur stationären Phase binden zuoberst auf der Säule, die mit niedrigerer Affinität binden darunter. Der *Displacer* hat eine höhere Affinität als die bereits gebundenen Peptide und verdrängt dadurch die anderen Komponenten, bis diese stufenweise nach ihrer jeweiligen Affinität zur stationären Phase hin aufgetrennt von der Säule eluieren. Diese Methode erlaubt eine Auftrennung der einzelnen Komponenten des Peptidgemisches mit hoher Reinheit sowie eine Aufkonzentrierung dieser in den einzelnen Stufen.

Die Analyse der Proben erfolgte durch Flüssigkeitschromatographie-Tandem Massenspektrometrie (LC-MS/MS). Anhand von drei verschiedenen „Suchmaschinen“ (Mascot, OMSSA, XITandem 2) wurden den Spektren Peptide zugeordnet. Mit Hilfe der *Blast Software* wurden dann zu den Peptidsequenzen passende Proteine vorgeschlagen.

3. ERGEBNISSE

Nachweis des NKCC2 als *Lipid raft* Protein

Die rbTAL Zellen wurden zunächst auf ihre Eignung im Versuchsaufbau hin untersucht. Wir konnten mit der *Reverse transcription*-PCR bestätigen, dass die Zellen V2-R mRNA, NKCC2 mRNA und mRNA für alle 3 NKCC2-Spleissvarianten (NKCC2-A, -B und -F) besitzen. Die Ergebnisse der *Real-time* PCR haben zusätzlich bestätigt, dass die rbTAL Zellen NKCC2 mRNA – wenn auch in geringerer Menge als *in vivo* - enthalten, da nur 15% der Menge, die in Kaninchen TALs nachgewiesen werden konnte, gemessen wurde. Kaum nachweisbare mRNA-Mengen wurden hingegen für den in Zellen ubiquitär vorhandenen NKCC1 gemessen. Die Validität unseres NKCC2 Antikörpers habe ich mittels Peptidblockade (Vorinkubation des Antikörpers mit 10-fachem Überschuss des Peptids) auf den rbTAL Zellen überprüft.

Das Homogenat aus rbTAL Extrakten wurde mittels der *Lipid raft* Präparation im Dichtegradienten in 10 verschiedene Fraktionen aufgeteilt. Hierbei konnte ich zeigen, dass sich unter Kontrollbedingungen bei kultivierten rbTAL Zellen ca. 40% bzw. beim Rattennierenhomogenat ca. 70% des NKCC2 in den *Raft* Fraktionen mit geringer Dichte befinden. Eine Identifikation der *Lipid rafts* innerhalb dieser Fraktionen erfolgte mit verschiedenen bereits bekannten *Raft*-Markerproteinen und -lipiden. Mittels Immunoblot wurden die Fraktionen auf die *Raft*-Markerproteine THP [42] und Flotillin-1 [43, 44] hin untersucht. Eindeutige Identifikation der *Lipid raft* enthaltenden Fraktionen im Bereich F4 bis F6 war so möglich (Abb.3.1). Als Negativkontrolle diente das Protein Clathrin [45], das nur in den Fraktionen mit hoher Dichte im Gradienten nachweisbar war (F8 bis F10).

Außerdem habe ich eine Lipidanalyse mittels Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Diese ergab einen erhöhten Anteil an Cholesterin und Sphingomyelin in den *Lipid rafts*; als Negativkontrolle diente der geringere Anteil an Phosphatidylcholin (Abb. 3.1) [26, 27]. Die Untersuchung des *Raft*-Markerlipids Gangliosid GM1 mittels *Dot blot* zeigte, dass dieses ebenfalls in den *Raft*-Fraktionen F4 bis F6 angereichert war [46].

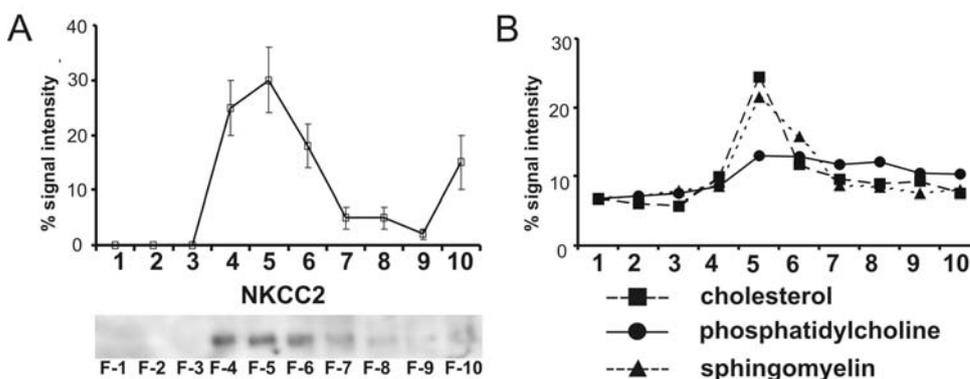


Abbildung 3.1. Rattennierenhomogenat wurde zur Identifizierung der *Lipid rafts* in 10 Fraktionen aufgeteilt. A: Immunoblot des NKCC2, der sich hauptsächlich in den Fraktionen F4 bis F6 befindet, die wir als *Raft*-Fraktionen identifiziert haben. B: Die Dünnschichtchromatographie zeigt eine Konzentrierung der in Rafts angereicherten Lipide Cholesterin und Sphingomyelin in den Fraktionen F4 bis F6.

Weiterhin habe ich die *Lipid rafts* elektronenmikroskopisch untersucht und vesikuläre Strukturen mit Durchmessern von 100-200 nm darstellen können, die mit verschiedenen Antikörpern markiert wurden. So konnte ich unter anderem das *Raft*-Markerlipid Gangliosid M1 (GM-1) und den NKCC2 darstellen (Abb. 3.2).

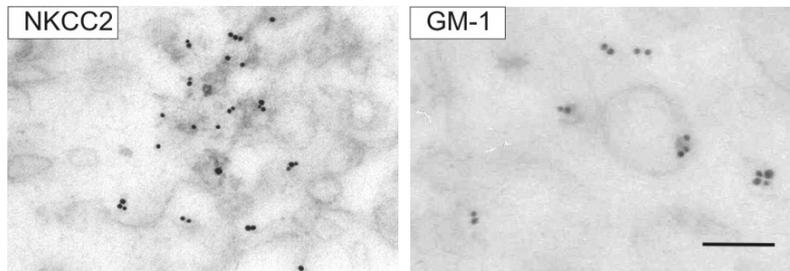


Abbildung 3.2. Elektronenmikroskopische Aufnahme der *Raft*-Strukturen mit Immunogold Markierung des NKCC2 und GM-1. Balken: 200 nm.

Transportaktivität des NKCC2 in *Lipid raft* Membrandomänen bei Cholesterindepletion

Die Depletion des Cholesterin aus der Plasmamembran an rbTAL Zellen mit Mevalonat und Lovastatin sowie mit M β CD zeigte, dass sich gegenüber der Kontrolle der Anteil des in den *Raft*-Fraktionen befindliche NKCC2 signifikant verringert und sich ein Teil des Kotransporters in die Fraktionen höherer Dichte verschoben hatte. Das *Lipid raft* Markerprotein Flotillin-1 blieb hiervon unbeeinflusst. Die Transportmessung des NKCC2 über $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme in *Xenopus laevis* Oocyten, die durch die Arbeitsgruppe von G. Gamba durchgeführt wurde [70], hat gezeigt, dass bereits nach 90 min Cholesterindepletion mit M β CD eine signifikant verringerte Transportaktivität bestand, die sich nach 180 minütiger Behandlung noch drastischer darstellte.

Analyse der *Lipid rafts* mit der Massenspektrometrie

Die LC-MS/MS-Methodik ermöglicht es, ein komplexes Proteingemisch auf seine Zusammensetzung hin zu untersuchen. Ich habe diese in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Schlüter *et al.* durchgeführt [70]. Um das *Lipid raft* Peptidgemisch zur genaueren Analyse sowohl besser aufzutrennen als auch innerhalb dieser Fraktionen eine Aufkonzentrierung gleich geladener Peptide zu erhalten, habe ich die *Displacement*-Chromatographie verwendet (Abb. 3.3A), die der Massenspektrometrischen Analyse (Abb. 3.3B) vorgeschaltet wurde.

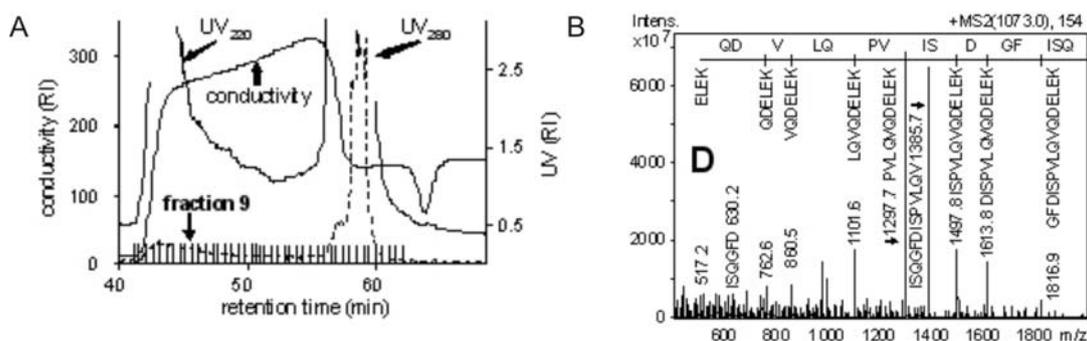


Abbildung 3.3. Massenspektrometrische Analyse eines *Lipid raft* Proteingemisches aus Rattennieren. A: Chromatogramm der Kationen-Austauscher Displacement Chromatographie von tryptischen Peptiden eines Proteingemisches aus der *Lipid raft* Fraktion. Anhand der Kurve

für die Leitfähigkeit (conductivity) lässt sich die Retention des Peptidgemisches erkennen, welches in 39 Fraktionen (kleine Striche auf der Skala der Retentionszeit – retention time) gesammelt wurde. B: LC-MS/MS Chromatogramm der Fraktion 9 aus dem in A dargestellten Chromatogramm. Es zeigt das Spektrum eines zweifach geladenen Peptid-Ions (2+), welches dem Signal mit der Masse m/z -1073.0 aus der MS/MS Analyse entspricht. Das individuelle Peptid-Ion wird durch den dargestellten Aminosäure Code beschrieben (ISQGFDISPVLQV) und lässt sich eindeutig der Proteinsequenz des NKCC2 zuordnen.

Die Analyse der 39 Fraktionen im Massenspektrometer ergab eine Liste mit verschiedenen, bereits als *Raft*-Proteine identifizierten Kandidaten wie dem THP [42], der Na^+ - K^+ -ATPase (NKA) [45], dem Moesin als einem Mitglied der *Ezrin-Radixin-Moesin* (ERM) Familie [47], und der Rho GTPase Cdc42 [48, 49]. Auch konnte ich in den *Lipid raft* Fraktionen das NKCC2 eindeutig identifizieren (siehe Abb. 3.3) und somit die Ergebnisse aus dem Western blot bestärken. Andere Kandidatenproteine waren beispielsweise die Rho GTPase Miro-2, die in Mitochondrien vorkommt und Cytochrom P450, ein Hämprotein mit enzymatischer Aktivität, welches hauptsächlich in der Leber vorkommt und zur Oxidation zahlreicher Substanzen notwendig ist. Auch in der Niere wurden bereits verschiedene Isoformen aus der Cytochrom P450 Familie nachgewiesen, die im ER und in den Mitochondrien lokalisiert waren.

Stimulation des NKCC2 mit ADH

Durch Kurzzeitstimulation (60 min) von kultivierten rbTAL Zellen oder von Ratten mit ADH kommt es zu einer signifikanten Verstärkung des NKCC2-immunreaktiven Signals in der apikalen Membran sowie im Zellkörper des TAL Epithels. In der Abbildung 3.4 ist dieser Effekt an den rbTAL Zellen dargestellt.

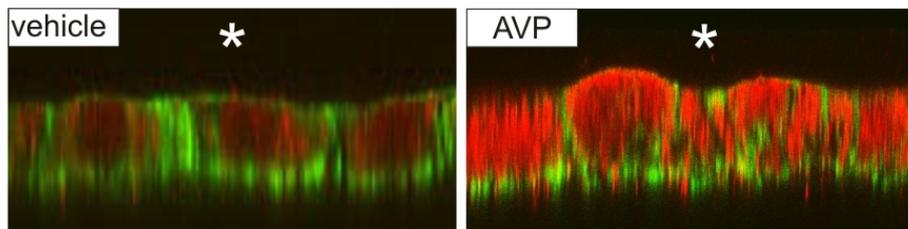


Abbildung 3.4. ADH bewirkt eine Verstärkung des NKCC2 Signals und dessen apikale Konzentrierung in rbTAL Zellen (ADH 0,1 μM , 60 min; Z-Achse. NKCC2 rot, Phalloidin [F-Aktin Markierung] grün). Apikale Seite (*).

Die Analyse der *Lipid raft* Präparation aus dem rbTAL Zellextrakt zeigte nach 1h Stimulation eine erhöhte Präsenz (+ 30%) des NKCC2 in den *Rafts*. Das *Lipid raft* Markerprotein Flotillin-1 blieb hiervon unbeeinflusst. Mit Blick auf die cAMP Ausschüttung als Antwort auf eine V2-R Stimulation durch ADH haben wir die zelluläre Konzentration von cAMP mit ELISA gemessen. Nach Gabe von ADH konnten wir einen signifikanten cAMP Anstieg (+ 17%) in den Zellen messen. Die Kombination von ADH Gabe und einer Cholesterindepletion führte ebenfalls zu einem, wenn auch geringeren, Anstieg des intrazellulären cAMP (+ 6%). Diese Ergebnisse bestätigen die durch ADH ausgelöste Signalgebung.

Bei gleichzeitiger Applikation von ADH und dem Translationshemmer Cycloheximid wurde nach 60 min dennoch ein Zuwachs der NKCC2-Proteinmenge beobachtet, der auf eine geänderte

Proteinstabilität hinweist. Nach 4h war dann die (erwartete) Verringerung der NKCC2-Menge eingetreten.

In Biotinylierungsversuchen wurde weiterhin gezeigt, dass im Sinne einer Transporteraktivierung speziell die Menge des in der apikalen Membran lokalisierten NKCC2 nach einstündiger ADH Gabe angestiegen war. Nach Cholesterindepletion sinkt sowohl bei Vehikel- als auch bei den ADH-behandelten Zellen das Signal für apikal lokalisierten, biotinylierten Kotransporter. Somit lässt sich schließen, dass die Ausbildung von *Rafts* wahrscheinlich an der Aktivierung des NKCC2 beteiligt ist.

Stimulation des NCC mit ADH

Aufgrund der Ergebnisse, die ich beim Kotransporter des TAL, dem NKCC2, erzielt habe, ergab sich die Frage, ob auch der Kotransporter des DCT, der NCC, durch V2-R abhängige ADH Stimulation beeinflussbar ist. Da wir die Lokalisation des V2-R im DCT bereits nachgewiesen haben [24], haben wir Ratten mit dDAVP, einem synthetischen ADH-Analogen stimuliert und konnten im frühen DCT, dem 11 β HSD2-negativen DCT1, eine V2-R spezifische Steigerung der phosphorylierten Form des NCC feststellen. Die Gesamtmenge des NCC blieb nach Kurzzeitstimulation (30 min) gleich, was auf eine Umverteilung des bereits zytosolisch vorhandenen Transporters an die Plasmamembran und auf eine Phosphorylierung hinweist (Abb. 3.5).

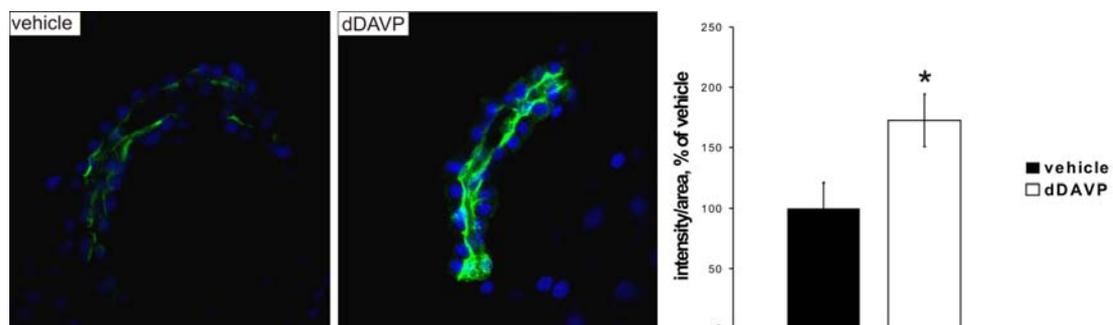


Abbildung 3.5. Nach Kurzzeitstimulation mit dDAVP zeigte sich eine signifikante Erhöhung des apikalen Signals für den phosphorylierten NCC (+72 %, $p < 0,05$). Konfokale Aufnahme von isolierten DCT aus der Rattenniere (dDAVP 1 μ M, 30 min. pNCC grün, Dapi Kernmarkierung blau).

4. DISKUSSION

Verteilung des NKCC2 und NCC in *Lipid rafts*

Die anteilige Lokalisierung des NKCC2 in den *Rafts* habe ich im Western blot, immunhistochemisch, elektronenmikroskopisch und in der Massenspektrometrie nachgewiesen und diese Ergebnisse durch Cholesterindepletion verifiziert. Ich habe festgestellt, dass sich in den kultivierten rbTAL Zellen ca. 40% des Transporters und im Rattennierenhomogenat ca. 70% des NKCC2 in den *Lipid raft* Membrandomänen befinden, was darauf zurückzuführen ist, dass sich bei Zellen in Kultur im Vergleich zum lebenden Organismus Faktoren wie die Transporteraktivität im Allgemeinen auf einem niedrigeren Niveau einpegeln.

Aus aufgereinigtem Gewebe der Ratte konnte auch der NCC des distalen Konvoluts durch Western blot anteilig als *Lipid raft* Protein identifiziert werden. Als Positivkontrolle diente mir hierbei das Protein Flotillin-1 [44], als Negativkontrollen Clathrin [45, 50] und der Transferrin Rezeptor [50], sowie als Lipidkontrolle der Nachweis der Lipide GM-1, Cholesterin und Sphingomyelin in den *Rafts* [27, 46]. Das für Western blot Analysen häufig genutzte Caveolin-1 als *Raft* Markerprotein habe ich für die Versuche nicht verwendet, da es für dieses Protein keine Immunreaktivität im TAL gibt [51].

Die anteilige Integration von Membranproteinen und spezifisch von renalen Transporterproteinen epithelialer Herkunft ist an sich nicht neu. So konnten *Lipid raft* Nachweise auch für renale Proteine wie das Glykosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-verankerte THP [42], den Natrium-Wasserstoff-Austauscher (NHE3) [52] und durch unsere Arbeitsgruppe für die basolateral lokalisierte NKA [45] erbracht werden. Auch in anderen Organen konnten Transporterproteine in *Rafts* identifiziert werden, wie beispielsweise der im Gehirn exprimierte Glutamat Transporter EAAT2 (*excitatory amino acid transporter 2*) [53].

Funktionen der *Lipid rafts*

Membranproteine gelangen nach ihrer Translation in den Golgi-Apparat, wo sie weitere Modifikationen wie Glykosylierungen und proteolytische Spaltungen erfahren [54]. Vom Trans-Golgi Netzwerk (TGN) aus werden die Proteine dann zu ihrem endgültigen Bestimmungsort in der Zelle, beispielsweise der Plasmamembran, und von hier aus weiter zum degradativen Apparat transloziert [55-58]. Damit dies funktioniert, muss es in der Zelle Mechanismen geben, die eine fehlerfreie Sortierung gewährleisten. Hierfür sind die als *Lipid rafts* bezeichneten Membrandomänen in der Diskussion. Beispielsweise wurde von Klemm *et al.* an Hefezellen gezeigt, dass immunisierte sekretorische Vesikel nach Sortierung am TGN selektiv Ergosterol und Sphingolipide angereichert hatten. Dies wurde so interpretiert, dass *Lipid rafts* eine Rolle bei der Sortierung nach Verlassen des Golgi-Apparates spielen könnten [59]. Dies eröffnet auch eine Perspektive für die *Lipid rafts* bei der Sortierung renaler Membranproteine wie NKCC2 und NCC.

Einfluss der Cholesterindepletion auf Lipid rafts

Die verringerte Membranpräsenz des NKCC2 nach Cholesterin-Synthesehemmung durch Gabe von Mevalonat und Lovastatin sowie die gleichzeitige Membranextraktion von Cholesterin durch Methyl- β -Cyclodextrin konnte an biotinylierten rbTAL Zellen und an isolierten *Lipid raft* Fraktionen gezeigt werden. Die Untersuchung von mit NKCC2 transfizierten *Xenopus laevis* Oocyten, einem etablierten Modell für die Messung der Transportaktivität des Kotransporters, hat ebenfalls eine verringerte Aktivität des NKCC2 nach Membran Cholesterindepletion mit lediglich Methyl- β -Cyclodextrin ergeben. Die Assoziation des NKCC2 in *Raft*-Membrandomänen scheint für das *Trafficking*, die apikale Sortierung und seine Funktion förderlich und insbesondere in der phosphorylierten Form funktionell bedeutsam zu sein [70].

Andere renale Transporter wie NHE3 zeigten ein ähnliches Verhalten in Bezug auf die Rolle der *Rafts* bei apikalen Sortierungsvorgängen [52]. Funktionell bewirkt eine Cholesterindepletion allerdings nicht durchweg den gleichen Effekt. So änderte sich die Expression und Aktivität des Amilorid-sensitiven, in *Lipid rafts* lokalisierten epithelialen Na^+ -Transporters (ENaC) in Nierenzelllinien nach Cholesterindepletion nicht oder nur mäßig [60]. Die Gegenwart von Cholesterin in Membranen hat offenbar sehr unterschiedliche Wirkung auf die Funktion der verschiedenen Membrantransporter; was mit der spezifischen molekularen Bauweise der einzelnen Transporter sowie mit der Heterogenität ihrer Assoziation mit zytoplasmatischen Bindungspartnern zusammenhängen könnte [61, 62].

Massenspektrometrie

Die für die massenspektrometrische Analyse notwendige vorgeschaltete Aufarbeitung meines Probengemisches stellte eine Herausforderung insofern dar, da ich durch die Untersuchung von *Lipid rafts* speziell membrangebundene Proteine identifizieren wollte. Konventionell wird vor der Massenspektrometrie oft die 2D-Elektrophorese vorgeschaltet, jedoch sind Membranproteine in polaren Lösungsmitteln nur schwer löslich. Daher habe ich zur Auftrennung des Peptidgemisches die *Displacement*-Chromatographie verwendet, die sich als optimal für die folgende massenspektrometrische Analyse herausstellte. Die Mehrheit der identifizierten Proteine gehört zur Gruppe der Membranproteine. Hierdurch konnte eine Alternative zur gegenwärtig durchgeführten Gradienten Elutionschromatographie als primären aufreinigenden Schritt für die nachfolgende massenspektrometrische Analyse von Membranproteinen aufgezeigt werden [71].

Die Identifikation von bereits als *Raft*-Proteinen bekannten Kandidaten wie Uromodulin (THP), NKA, Moesin und der Rho GTPase Cdc42 bestätigt die gewählte Aufarbeitungsmethode. Außerdem konnte ich auch das NKCC2 in der isolierten *Raft* Fraktion finden, was die Ergebnisse aus den Western blots und immunohistochemischen Färbungen bestärkte. Um spezifische, für das *Sorting* des NKCC2 verantwortliche Proteine zu charakterisieren, bedarf es jedoch weiterer Experimente, die den Rahmen der vorliegenden Arbeit sprengen und Gegenstand zukünftiger Forschungsarbeiten im Zuge dieses Projektes sind.

Einige der Kandidatenproteine sind mitochondriale Proteine, wie die Rho GTPase Miro-2 oder Proteine der Cytochrom P450 Familie. Das Vorhandensein von mitochondrialen Proteinen in

Lipid raft Membranen ist noch nicht vollständig geklärt, obwohl es einige Arbeiten gibt, die Hinweise darauf fanden. Beispielsweise haben Bae *et al.* eine Studie an *Lipid rafts* aus Ratten Leber bzw. Yu *et al.* an *Rafts* aus isolierten Sammelrohren aus der Ratte durchgeführt und hierbei ebenfalls mitochondriale Proteine wie cytochrome *c oxidase subunit Va*, *mitochondrial ATP synthase* und *voltage-dependent anion-selective channels* gefunden. [63, 64]. Da einige mitochondriale Proteine auch in der Plasmamembran nachgewiesen wurden [63] könnten diese in die *Lipid rafts* eingebaut worden sein.

Zelloberflächenexpression von NKCC2 und NCC unter Stimulation durch ADH

Die Kurzzeitstimulation mit ADH resultiert in der Niere nicht nur in einer Aktivierung des AQP2 und der NKA im Sammelrohr [65], sondern fördert auch die transepitheliale Salzresorption im TAL [22, 66-68]. Die Aktivierung des NKCC2 und des NCC durch Vasopressin erfolgt durch die Bindung des ADH an den basolateralen V2-R, wodurch der intrazelluläre cAMP-Gehalt ansteigt und die Proteinkinase A aktiviert wird, was eine Phosphorylierung des Kotransporters in der apikalen Membran zur Folge hat. Die Viabilität der von uns genutzten rbTAL Zellen wurde hinsichtlich dieser Parameter ausreichend verifiziert [24, 45, 66]. Eine Erhöhung der NKCC2 mRNA nach ADH Stimulation konnte nicht festgestellt werden, was sich aber durch eine verzögerte Induktion erklären lässt [24, 69]. Insgesamt konnte ich feststellen, dass unter dem Einfluss des ADH ein signifikant stärkerer Einbau des NKCC2 in die Plasmamembran und hier in die *Lipid raft* Membrandomänen stattfand.

Beim Transporter des DCT, dem NCC, blieb die Gesamtmenge des Proteins in der Zelle nach Kurzzeitstimulation unverändert. Die verstärkte Oberflächenexpression des phosphorylierten NCC im frühen DCT, dem 11 β HSD2-negativen DCT1, kann daher nicht durch Neusynthese, sondern durch die Umverteilung des zytosolisch bereits vorhandenen Proteins an die Plasmamembran und Phosphorylierung zustande gekommen sein. Das Ansprechen des Transporters im 11 β HSD2-negativen DCT1 auf die Gabe von dDAVP zeigt eine neue V2-R abhängige Signalkaskade für den DCT1 auf, die der Feinregulation der NaCl Reabsorption im DCT dient [72].

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die von mir umfassend untersuchten *Lipid raft* Membrandomänen eine wichtige Rolle für das *Trafficking*, die polare Sortierung und die Aktivität des NKCC2 spielen. Durch V2-R spezifische ADH-Stimulation lässt sich der Anteil dieses Transporters in *Rafts* signifikant erhöhen und durch Zerstörung der *Lipid rafts* verringert sich die Aktivität des NKCC2. Auch der NCC ist in den *Raft* Domänen nachweisbar und zeigt nach V2-R spezifischer Stimulation eine verstärkte Phosphorylierung in der apikalen Membran im DCT1. Die massenspektrometrische Analyse der *Lipid raft* Fraktion ergab eine Liste von Proteinen, die den NKCC2 einschließt und von denen einige noch nicht publiziert sind und somit die Grundlage für weitere Experimente bilden.

5. REFERENZLISTE

1. Russell, J.M., *Sodium-potassium-chloride cotransport*. *Physiol Rev*, 2000. **80**(1): p. 211-76.
2. Xu, J.C., et al., *Molecular cloning and functional expression of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(6): p. 2201-5.
3. Delpire, E., et al., *Molecular cloning and chromosome localization of a putative basolateral Na(+)-K(+)-2Cl- cotransporter from mouse inner medullary collecting duct (mIMCD-3) cells*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(41): p. 25677-83.
4. Gamba, G., et al., *Molecular cloning, primary structure, and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(26): p. 17713-22.
5. Payne, J.A. and B. Forbush, 3rd, *Molecular characterization of the epithelial Na-K-Cl cotransporter isoforms*. *Curr Opin Cell Biol*, 1995. **7**(4): p. 493-503.
6. Payne, J.A. and B. Forbush, 3rd, *Alternatively spliced isoforms of the putative renal Na-K-Cl cotransporter are differentially distributed within the rabbit kidney*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(10): p. 4544-8.
7. Ohlsson, A., et al., *A variant of Bartter's syndrome. Bartter's syndrome associated with hydramnios, prematurity, hypercalciuria and nephrocalcinosis*. *Acta Paediatr Scand*, 1984. **73**(6): p. 868-74.
8. Sieck, U.V. and A. Ohlsson, *Fetal polyuria and hydramnios associated with Bartter's syndrome*. *Obstet Gynecol*, 1984. **63**(3 Suppl): p. 22S-24S.
9. Bartter, F.C., et al., *Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis. A new syndrome*. *Am J Med*, 1962. **33**: p. 811-28.
10. McCredie, D.A., E. Rotenberg, and A.L. Williams, *Hypercalciuria in potassium-losing nephropathy: a variant of Bartter's syndrome*. *Aust Paediatr J*, 1974. **10**(5): p. 286-95.
11. Simon, D.B., et al., *Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2*. *Nat Genet*, 1996. **13**(2): p. 183-8.
12. Goodman, A.D., A.H. Vagnucci, and P.M. Hartroft, *Pathogenesis of Bartter's syndrome*. *N Engl J Med*, 1969. **281**(26): p. 1435-9.
13. Seyberth, H.W., et al., *Role of prostaglandins in hyperprostaglandin E syndrome and in selected renal tubular disorders*. *Pediatr Nephrol*, 1987. **1**(3): p. 491-7.
14. Gimenez, I., P. Isenring, and B. Forbush, *Spatially distributed alternative splice variants of the renal Na-K-Cl cotransporter exhibit dramatically different affinities for the transported ions*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(11): p. 8767-70.
15. Igarashi, P., et al., *Cloning, embryonic expression, and alternative splicing of a murine kidney-specific Na-K-Cl cotransporter*. *Am J Physiol*, 1995. **269**(3 Pt 2): p. F405-18.
16. Plata, C., et al., *Alternatively spliced isoform of apical Na(+)-K(+)-Cl(-) cotransporter gene encodes a furosemide-sensitive Na(+)-Cl(-)cotransporter*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001. **280**(4): p. F574-82.
17. Plata, C., et al., *Functional properties of the apical Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter isoforms*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(13): p. 11004-12.
18. Yang, T., et al., *Localization of bumetanide- and thiazide-sensitive Na-K-Cl cotransporters along the rat nephron*. *Am J Physiol*, 1996. **271**(4 Pt 2): p. F931-9.
19. Oppermann, M., et al., *Macula densa control of renin secretion and preglomerular resistance in mice with selective deletion of the B isoform of the Na,K,2Cl cotransporter*. *J Am Soc Nephrol*, 2006. **17**(8): p. 2143-52.

20. Castrop, H. and J. Schnermann, *Isoforms of renal Na-K-2Cl cotransporter NKCC2: expression and functional significance*. Am J Physiol Renal Physiol, 2008. **295**(4): p. F859-66.
21. Field, M.J., B.A. Stanton, and G.H. Giebisch, *Influence of ADH on renal potassium handling: a micropuncture and microperfusion study*. Kidney Int, 1984. **25**(3): p. 502-11.
22. Molony, D.A., et al., *ADH increases apical Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ entry in mouse medullary thick ascending limbs of Henle*. Am J Physiol, 1987. **252**(1 Pt 2): p. F177-87.
23. Nishimoto, G., et al., *Arginine vasopressin stimulates phosphorylation of aquaporin-2 in rat renal tissue*. Am J Physiol, 1999. **276**(2 Pt 2): p. F254-9.
24. Mutig, K., et al., *Vasopressin V2 receptor expression along rat, mouse, and human renal epithelia with focus on TAL*. Am J Physiol Renal Physiol, 2007. **293**(4): p. F1166-77.
25. Nonoguchi, H., et al., *Immunohistochemical localization of V2 vasopressin receptor along the nephron and functional role of luminal V2 receptor in terminal inner medullary collecting ducts*. J Clin Invest, 1995. **96**(4): p. 1768-78.
26. de Almeida, R.F., A. Fedorov, and M. Prieto, *Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts*. Biophys J, 2003. **85**(4): p. 2406-16.
27. Simons, K. and E. Ikonen, *Functional rafts in cell membranes*. Nature, 1997. **387**(6633): p. 569-72.
28. Pralle, A., et al., *Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells*. J Cell Biol, 2000. **148**(5): p. 997-1008.
29. Brown, D.A. and J.K. Rose, *Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface*. Cell, 1992. **68**(3): p. 533-44.
30. Field, K.A., D. Holowka, and B. Baird, *Compartmentalized activation of the high affinity immunoglobulin E receptor within membrane domains*. J Biol Chem, 1997. **272**(7): p. 4276-80.
31. van Meer, G. and K. Simons, *Lipid polarity and sorting in epithelial cells*. J Cell Biochem, 1988. **36**(1): p. 51-8.
32. Fahrenholz, F., U. Klein, and G. Gimpl, *Conversion of the myometrial oxytocin receptor from low to high affinity state by cholesterol*. Adv Exp Med Biol, 1995. **395**: p. 311-9.
33. Coskun, U. and K. Simons, *Membrane rafting: From apical sorting to phase segregation*. FEBS Lett, 2009.
34. Scott, D.M., et al., *Maintenance of expression of differentiated function of kidney cells following transformation by SV40 early region DNA*. Exp Cell Res, 1986. **166**(2): p. 391-8.
35. Scott, D.M., K. Zierold, and R. Kinne, *Development of differentiated characteristics in cultured kidney (thick ascending loop of Henle) cells*. Exp Cell Res, 1986. **162**(2): p. 521-9.
36. Eveloff, J., W. Haase, and R. Kinne, *Separation of renal medullary cells: isolation of cells from the thick ascending limb of Henle's loop*. J Cell Biol, 1980. **87**(3 Pt 1): p. 672-81.
37. Ehehalt, R., et al., *Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts*. J Cell Biol, 2003. **160**(1): p. 113-23.
38. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.

39. Becker, C.M., W. Hoch, and H. Betz, *Sensitive immunoassay shows selective association of peripheral and integral membrane proteins of the inhibitory glycine receptor complex*. J Neurochem, 1989. **53**(1): p. 124-31.
40. Santoni, V., M. Molloy, and T. Rabilloud, *Membrane proteins and proteomics: un amour impossible?* Electrophoresis, 2000. **21**(6): p. 1054-70.
41. Ruth, M.C., et al., *Analysis of membrane proteins from human chronic myelogenous leukemia cells: comparison of extraction methods for multidimensional LC-MS/MS*. J Proteome Res, 2006. **5**(3): p. 709-19.
42. Cavallone, D., N. Malagolini, and F. Serafini-Cessi, *Mechanism of release of urinary Tamm-Horsfall glycoprotein from the kidney GPI-anchored counterpart*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **280**(1): p. 110-4.
43. Santamaria, A., et al., *PTOVI enables the nuclear translocation and mitogenic activity of flotillin-1, a major protein of lipid rafts*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(5): p. 1900-11.
44. Bickel, P.E., et al., *Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins*. J Biol Chem, 1997. **272**(21): p. 13793-802.
45. Welker, P., et al., *Role of lipid rafts in membrane delivery of renal epithelial Na⁺-K⁺-ATPase, thick ascending limb*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007. **292**(3): p. R1328-37.
46. Mazzone, A., et al., *Isolation and characterization of lipid microdomains from apical and basolateral plasma membranes of rat hepatocytes*. Hepatology, 2006. **43**(2): p. 287-96.
47. Itoh, K., et al., *Cutting edge: negative regulation of immune synapse formation by anchoring lipid raft to cytoskeleton through Cbp-EBP50-ERM assembly*. J Immunol, 2002. **168**(2): p. 541-4.
48. Prag, S., et al., *Activated ezrin promotes cell migration through recruitment of the GEF Dbl to lipid rafts and preferential downstream activation of Cdc42*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(8): p. 2935-48.
49. Sinha, S. and W. Yang, *Cellular signaling for activation of Rho GTPase Cdc42*. Cell Signal, 2008. **20**(11): p. 1927-34.
50. Harder, T., et al., *Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components*. J Cell Biol, 1998. **141**(4): p. 929-42.
51. Breton, S., et al., *Basolateral distribution of caveolin-1 in the kidney. Absence from H⁺-atpase-coated endocytic vesicles in intercalated cells*. J Histochem Cytochem, 1998. **46**(2): p. 205-14.
52. Murtazina, R., et al., *Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 activity and trafficking are lipid Raft-dependent*. J Biol Chem, 2006. **281**(26): p. 17845-55.
53. Tian, G., et al., *Increased expression of cholesterol 24S-hydroxylase results in disruption of glial glutamate transporter EAAT2 association with lipid rafts: a potential role in Alzheimer's disease*. J Neurochem.
54. Mellman, I. and G. Warren, *The road taken: past and future foundations of membrane traffic*. Cell, 2000. **100**(1): p. 99-112.
55. Griffiths, G. and K. Simons, *The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex*. Science, 1986. **234**(4775): p. 438-43.
56. Traub, L.M. and S. Kornfeld, *The trans-Golgi network: a late secretory sorting station*. Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(4): p. 527-33.
57. Bard, F. and V. Malhotra, *The formation of TGN-to-plasma-membrane transport carriers*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2006. **22**: p. 439-55.
58. Pfeffer, S.R., *Unsolved mysteries in membrane traffic*. Annu Rev Biochem, 2007. **76**: p. 629-45.

59. Klemm, R.W., et al., *Segregation of sphingolipids and sterols during formation of secretory vesicles at the trans-Golgi network*. J Cell Biol, 2009. **185**(4): p. 601-12.
60. Shlyonsky, V.G., F. Mies, and S. Sariban-Sohraby, *Epithelial sodium channel activity in detergent-resistant membrane microdomains*. Am J Physiol Renal Physiol, 2003. **284**(1): p. F182-8.
61. Butterworth, M.B., et al., *The deubiquitinating enzyme UCH-L3 regulates the apical membrane recycling of the epithelial sodium channel*. J Biol Chem, 2007. **282**(52): p. 37885-93.
62. Gamba, G., *Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters*. Physiol Rev, 2005. **85**(2): p. 423-93.
63. Bae, T.J., et al., *Lipid raft proteome reveals ATP synthase complex in the cell surface*. Proteomics, 2004. **4**(11): p. 3536-48.
64. Yu, M.J., et al., *Large-scale quantitative LC-MS/MS analysis of detergent-resistant membrane proteins from rat renal collecting duct*. Am J Physiol Cell Physiol, 2008. **295**(3): p. C661-78.
65. Djelidi, S., et al., *Basolateral translocation by vasopressin of the aldosterone-induced pool of latent Na-K-ATPases is accompanied by alpha1 subunit dephosphorylation: study in a new aldosterone-sensitive rat cortical collecting duct cell line*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(9): p. 1805-18.
66. Amlal, H., et al., *Na(+)-K+(NH4+)-2Cl- cotransport in medullary thick ascending limb: control by PKA, PKC, and 20-HETE*. Am J Physiol, 1996. **271**(2 Pt 1): p. C455-63.
67. Hebert, S.C., R.M. Culpepper, and T.E. Andreoli, *NaCl transport in mouse medullary thick ascending limbs. III. Modulation of the ADH effect by peritubular osmolality*. Am J Physiol, 1981. **241**(4): p. F443-51.
68. Meade, P., et al., *cAMP-dependent activation of the renal-specific Na+-K+-2Cl- cotransporter is mediated by regulation of cotransporter trafficking*. Am J Physiol Renal Physiol, 2003. **284**(6): p. F1145-54.
69. Robert-Nicoud, M., et al., *Transcriptome of a mouse kidney cortical collecting duct cell line: effects of aldosterone and vasopressin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(5): p. 2712-6.
70. Welker, P., Böhlick, A., Mutig, K., Salanova, M., Kahl, T., Schlüter, H., Blottner, D., Ponce-Coria, J., Gamba, G., Bachmann, S., *Renal Na⁺-K⁺-Cl⁻-cotransporter activity and vasopressin-induced trafficking are lipid raft-dependent*. Am J Physiol Renal Physiol, 2008. **295**(3): p. F789-802.
71. Trusch, M., Böhlick, A., Hildebrand, D., Lichtner, B., Bertsch, A., Kohlbacher, O., Bachmann, S., Schlüter, H., *Application of displacement chromatography for the analysis of a lipid raft proteome*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010. **878**(3-4): p. 309-14.
72. Mutig, K., Saritas, T., Uchida, S., Kahl, T., Borowski, T., Paliege, A., Böhlick, A., Bleich, M., Shan, Q., Bachmann, S., *Short-term stimulation of the thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻-cotransporter by vasopressin involves phosphorylation and membrane translocation*. Am J Physiol Renal Physiol, 2010. **298**(3): p. F502-9.

6. ANTEILSERKLÄRUNG

Die Promovendin hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

Publikation 1:

Welker P*, Böhlick A*, Mutig K, Salanova M, Kahl T, Schlüter H, Blottner D, Ponce-Coria J, Gamba G, Bachmann S, *Renal Na⁺K⁺Cl⁻-cotransporter activity and vasopressin-induced trafficking are lipid-raft dependent*. Am J Physiol Renal Physiol. 2008 Sep; 295(3): F789-802.

* Doppel-Erstautorenschaft

ISI Impact Factor 2008: 3,890

ca. 30 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Bei dieser Publikation habe ich die *Lipid raft* Präparation aus kultivierten Zellen und aus Gewebe, die Darstellung dieser mit Dünnschichtchromatographie, Dot blot, Western blot, sowie im Elektronenmikroskop durchgeführt. Außerdem habe ich die Zellkulturversuche mit Doppelfärbung von Cholera-toxin-B und NKCC2, die Cholesteroldepletionen und die Stimulationsversuche mit Vasopressin durchgeführt und die Zellen immunhistochemisch angefärbt und am konfokalen Mikroskop mit Darstellung der Z-Achse und Messung der Fluoreszenzintensität in der apikalen Schicht ausgewertet. Die aufgeführten Versuche habe ich mitgeplant und hatte wesentlichen Anteil an der Erstellung der Bildtafeln für die Publikation. Auch bei der Erstellung des Manuskriptes hatte ich großen Anteil.

Publikation 2:

Trusch M, Böhlick A, Hildebrand D, Lichtner B, Bertsch A, Kohlbacher O, Bachmann S, Schlüter H, *Application of displacement chromatography for the analysis of a lipid raft proteome*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2010 Feb 1; 878(3-4): 309-14.

ISI Impact Factor 2010: 2,777

ca. 65 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Mein Anteil bei dieser Arbeit umfasst die *Lipid raft* Präparation aus spezifischen Bereichen der Niere von Wistar Ratten und die Kontrolle dieser Probe im Western blot. Ich habe aus der erhaltenen Probe die Membranproteine für die massenspektrometrische Analyse extrahiert und unter Anleitung die Entsalzung auf einer *reversed-phase* Säule, die anschließende *Displacement*-Chromatographie und die Massenspektrometrie durchgeführt sowie die folgende Auswertung der Daten mit der BLAST Software. Auch bei der Erstellung der Bildtafeln Fig. 2, Fig. 3 und Fig. 4 und bei Teilen des Manuskriptes habe ich wesentlich mitgewirkt.

Publikation 3:

Mutig K, Saritas T, Uchida S, Kahl T, Borowski T, Paliege A, Böhlick A, Bleich M, Shan Q, Bachmann S, *Short-term stimulation of the thiazide-sensitive Na⁺,Cl⁻-cotransporter by vasopressin involves phosphorylation and membrane translocation*. Am J Physiol Renal Physiol. 2010 Mar; 298(3): F502-9.

ISI Impact Factor 2010: 3,792

15-20 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Hier habe ich bei der Herstellung von Suspensionskulturen renaler Tubuli mittels enzymatischem Verdau mitgewirkt sowie bei der immunhistochemischen Markierung relevanter Transporterproteine wie pNCC. Außerdem war ich an der Auswertung dieser Tubuli am konfokalen Mikroskop beteiligt.

Alexandra Böhlick

Prof. Dr. S. Bachmann

7. PUBLIKATIONEN

Publikation 1:

Welker P*, Böhlick A*, Mutig K, Salanova M, Kahl T, Schlüter H, Blottner D, Ponce-Coria J, Gamba G, Bachmann S, **Renal Na⁺K⁺Cl⁻-cotransporter activity and vasopressin-induced trafficking are lipid-raft dependent.** Am J Physiol Renal Physiol. 2008 Sep; 295(3): F789-802.

* Doppel-Erstautorenschaft
ISI Impact Factor 2008: 3,890

Publikation 2:

Trusch M, Böhlick A, Hildebrand D, Lichtner B, Bertsch A, Kohlbacher O, Bachmann S, Schlüter H, **Application of displacement chromatography for the analysis of a lipid raft proteome.** J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2010 Feb 1; 878(3-4): 309-14.

ISI Impact Factor 2010: 2,777

Publikation 3:

Mutig K, Saritas T, Uchida S, Kahl T, Borowski T, Paliege A, Böhlick A, Bleich M, Shan Q, Bachmann S. **Short-term stimulation of the thiazide-sensitive Na⁺,Cl⁻-cotransporter by vasopressin involves phosphorylation and membrane translocation.** Am J Physiol Renal Physiol. 2010 Mar; 298(3): F502-9.

ISI Impact Factor 2010: 3,792

LEBENS LAUF

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Erklärung

„Ich, Alexandra Böhlick, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **Identifikation regulatorischer Proteine des Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Kotransporters (NKCC2) in der Niere** selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

24.01.2011

Alexandra Böhlick

WIDMUNG

Diese Arbeit ist meiner Großmutter Elisabeth Lehmann gewidmet.

DANKSAGUNG

Als erstes möchte ich Herrn Prof. Dr. S. Bachmann für die Möglichkeit danken, meine Dissertation in seinem Labor durchführen zu können, für die Vergabe der interessanten Aufgabenstellung, die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit und die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Weiterhin gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe und des gesamten Instituts, die mich auf meinem Weg begleitet haben. Besonders danken möchte ich dabei Pia Welker für ihre gute Betreuung und ständige Bereitschaft für Rückfragen während der Erstellung unserer gemeinsamen Publikation. Auch für die immer freundliche und exzellente technische Unterstützung im Labor durch Kerstin Riskowski, Frauke Serowka, Elisabeth Schindler, Petra Landmann, Petra Schrade und Frauke Grams möchte ich mich an dieser Stelle bedanken. Außerdem danke ich meinen Mitdoktoranden für die schöne Zeit, die interessanten Diskussionen und die Freundschaft über die Zeit im Labor hinaus, besonders Thomas Kahl, Kerim Mutig, Adelina Stößel, Tordis Borowski, Alex Paliege und Juliane Gadau.

Last but not least danke ich meiner Familie und meinen Freunden für die verständnisvolle Unterstützung in meinem Vorhaben. Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Mutter Annelie und meinem Freund Volker, die mir durch die Betreuung unserer Tochter viel Zeit zur Fertigstellung der Dissertation verschafft haben.